

This Page Is Inserted by IFW Operations
and is not a part of the Official Record

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representation of
The original documents submitted by the applicant.

Defects in the images may include (but are not limited to):

- BLACK BORDERS
- TEXT CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- FADED TEXT
- ILLEGIBLE TEXT
- SKEWED/SLANTED IMAGES
- COLORED PHOTOS
- BLACK OR VERY BLACK AND WHITE DARK PHOTOS
- GRAY SCALE DOCUMENTS

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

**As rescanning documents *will not* correct images,
please do not report the images to the
Image Problem Mailbox.**

THIS PAGE BLANK (USPTO)

⑨ 日本国特許庁 (JP)

⑩ 特許出願公開

⑫ 公開特許公報 (A)

昭63-264525

⑬ Int. Cl. 4

A 61 K 31/495

識別記号

ADD
ABA
ABE
ABG
ABL
ABN
ABX
ACJ
ACS

庁内整理番号

7431-4C

⑭ 公開 昭和63年(1988)11月1日

// C 07 D 303/48

7252-4C 審査請求 未請求 発明の数 1 (全6頁)

⑮ 発明の名称 **ピペラジン誘導体を含有する活性酸素産生抑制ならびに活性酸素除去作用を有する医薬組成物**

⑯ 特 願 昭62-96965

⑰ 出 願 昭62(1987)4月20日

⑱ 発 明 者 田 原 一 二 秋田県秋田市柳田糠塚42

⑲ 出 願 人 日本ケミファ株式会社 東京都千代田区岩本町2丁目2番3号

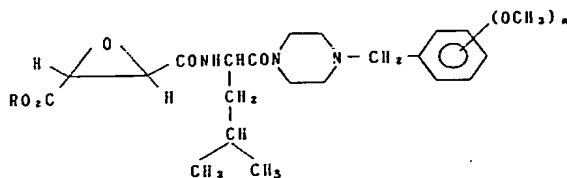
明 細 書

1. 発明の名称

ピペラジン誘導体を含有する活性酸素産生抑制ならびに活性酸素除去作用を有する医薬組成物

2. 特許請求の範囲

一般式



(式中、Rは酸素原子、^{又は}低級アルキル基を示し、nは0~3の整数を示す)で表わされるピペラジン誘導体又はその無毒性塩を有効成分として含有する活性酸素産生抑制ならびに活性酸素除去作用を有する医薬組成物。

3. 発明の詳細な説明

本発明は、ピペラジン誘導体を含有する活性酸

素産生抑制ならびに活性酸素除去作用を有する医薬組成物に関する。

安定状態の酸素(三重項酸素)がキサンチンオキシダーゼやNADPHオキシダーゼの関与により1電子を得ることでスーパーオキシドアニオンが生成し、さらにヒドロキシラジカル、過酸化水素、次亜塩素酸のアニオン、1重項酸素などの活性酸素が生じる。

これらの活性酸素のフリーラジカルは、顆粒球の殺菌作用、炎症作用、絨毛形成、アロキサン糖尿病、脂質過酸化、ヒスタミン遊離、DNAの破壊等

従って、活性酸素の異常な産生を抑制する物質は、抗炎症剤、抗リウマチ剤、消化管疾患治療剤、抗白内障剤、自己免疫疾患治療剤として有用である。

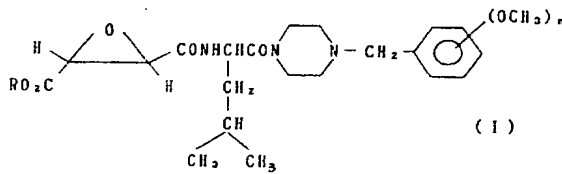
そこで、本発明者らは、活性酸素産生を抑制する化合物を見出すべく鋭意研究を行ってきた。その結果、下記一般式(1)で表わされる化合物が、優れた活性酸素抑制ならびに活性酸素除去作

特開昭63-264525(2)

用を有することを見出し、本発明を完成した。

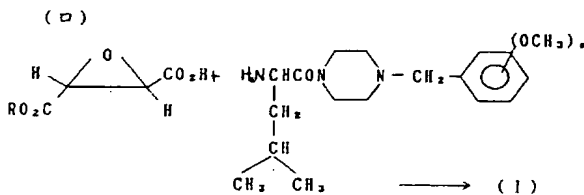
従って、本発明の目的は、有用な活性酸素産生抑制ならびに活性酸素除去作用を有する医薬組成物を提供するにある。

詳細には、次の一般式(1)



(式中、Rは水素原子、^{又は}低級アルキル基を示し、nは0~3の整数を示す)で表わされるピペラジン誘導体又はその無毒性塩を有効成分として含有する活性酸素産生抑制ならびに活性酸素除去作用を有する医薬組成物に関する。

上記一般式(1)で表わされる化合物は、本発明者らにより既に冠状動脈結紮による実験的心筋梗塞モデルで効果を示し、心筋梗塞の予防および治療剤として有用であることが知られている。



(式中、Rおよびnは前記と同じ意味を示す)

一般式(1)で表わされる化合物の具体例としては、下記のもの挙げることができる。

(2R,3R)-3-[(S)-1-(4-(4-メトキシフェニルメチル)ピペラジン-1-イルカルボニル)-3-メチルブチルカルバモイル]オキシラン-2-カルボン酸、

(2R,3R)-3-[(S)-1-(4-(3,4-ジメトキシフェニルメチル)ピペラジン-1-イルカルボニル)-3-メチルブチルカルバモイル]オキシラン-2-カルボン酸、

(2R,3R)-3-[(S)-3-メチル-1-(4-(2,3,4-トリメトキシフェニルメチル)ピペラジ

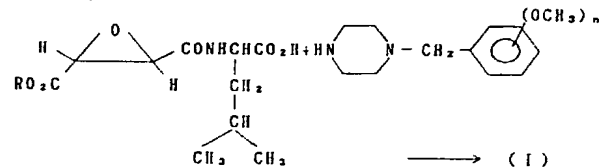
(特開昭57-169478、特開昭58-126879)

前記一般式(1)中のRが低級アルキル基の場合の例としては、メチル基、エチル基、プロピル基、イソブチル基、n-ブチル基、sec-ブチル基などが挙げられる。

また、無毒性塩としては、ナトリウム、カリウム、カルシウム、マグネシウム、さらには、トリアルキルアミン、ジベンジルアミン、N-低級アルキルピペリジン、α-フェネチルアミン、1-(1-ナフチル)エチルアミン、N-ベンジルβ-フェネチルアミンなどの無毒性塩、あるいは塩酸、臭化水素酸、ギ酸、硫酸、フマル酸、マレイン酸、酒石酸などとの無毒性塩が挙げられる。

前記一般式(1)で表わされる化合物は、たとえば次の方法により得ることができる。

(イ)



ン-1-イルカルボニル)ブチルカルバモイル]オキシラン-2-カルボン酸、

(2R,3R)-3-[(S)-3-メチル-1-(4-(3,4,5-トリメトキシフェニルメチル)ピペラジン-1-イルカルボニル)ブチルカルバモイル]オキシラン-2-カルボン酸、

(2R,3R)-3-[(S)-1-(4-ベンジルピペラジン-1-イルカルボニル)-3-メチルブチルカルバモイル]オキシラン-2-カルボン酸、

(2S,3S)-3-[(S)-1-(4-(4-メトキシフェニルメチル)ピペラジン-1-イルカルボニル)-3-メチルブチルカルバモイル]オキシラン-2-カルボン酸、

(2S,3S)-3-[(S)-1-(4-(3,4-ジメトキシフェニルメチル)ピペラジン-1-イルカルボニル)-3-メチルブチルカルバモイル]オキシラン-2-カルボン酸、

(2S,3S)-3-[(S)-3-メチル-1-(4-(2,3,4-トリメトキシフェニルメチル)ピペラジン-1-イルカルボニル)ブチルカルバモイル]

オキシラン-2-カルボン酸、
 (2S,3S)-3-(5)-3-メチル-1-(4-(3,4,5-トリメトキシフェニルメチル)ピペラジン-1-イルカルボニル)ブチルカルバモイル)オキシラン-2-カルボン酸、
 (2S,3S)-3-(5)-1-(4-ベンジルピペラジン-1-イルカルボニル)-3-メチルブチルカルバモイル)オキシラン-2-カルボン酸。

これらの化合物のエステル体または無毒性塩も本発明の有効成分である。

本発明における一般式(1)で表わされる化合物およびその無毒性塩が活性酸素産生抑制作用を有する医薬組成物として有用であることは、*in vitro* 及び *in vivo* におけるウサギ顆粒球からの活性酸素産生に及ぼす薬物の影響を観察することにより明らかになった。すなわち、被験薬物として、(2R,3R)-3-(5)-3-メチル-1-(4-(2,3,4-トリメトキシフェニルメチル)ピペラジン-1-イルカルボニル)ブチルカルバモイル)オキシラン-2-カルボン酸エチル $\frac{1}{2}$ 硫酸塩を用

また、本発明の有効成分である一般式(1)で表わされる化合物はマウスにおける急性毒性試験により、生体に対して安全性の高い物質であることがわかる。

本発明における一般式(1)の化合物およびその無毒性塩の投与量は、化合物の種類および患者の症状の程度によって異なるが、通常は1日約10mg~1gを患者に投与すればよい。

一般式(1)で表わされる化合物およびその塩は、これを活性酸素産生抑制ならびに活性酸素除去作用を有する医薬組成物として用いる場合、通常は製剤的担体と^添に製剤組成物の形態とされる。担体としては、使用形態に応じた薬剤を調製するのに通常使用される増量剤、結合剤、崩壊剤、滑沢剤等の希釈剤あるいは賦形剤が用いられる。

投与形態としては、注射剤、散剤、カプセル剤、顆粒剤、錠剤などいずれの形態でも可能である。

錠剤の形態として用いるに際しては担体として、例えば乳糖、白糖、塩化ナトリウム、ブドウ糖液、デンプン、炭酸カルシウム、結晶セルロース、ケ

い、兎の顆粒球のformyl-methionyl-leucyl-phenylalanine (FMLP)刺激により発生するルミノール依存性の化学発光に及ぼす影響を観察した実験において表1で示す様に被験薬物はコントロールに比較して、活性酸素の産生を30 μ Mで90%抑制した。

又*in vivo*における実験、すなわち被験薬物を兎に20mg/kg静注した後得られた顆粒球を用いた実験でも、コントロールに比べ有意の抑制を示した(表2)。

さらに、本発明における一般式(1)で表わされる化合物が除去(Scavenging)効果、すなわち発生した活性酸素を除去する効果も有することが、ハイポキサンチン-キサンチンオキシダーゼ系で発生する活性酸素に対する薬物の影響を調べる実験(実験3)、ならびにH₂O₂-NaOC₂系における薬物の効果(実験4)を調べる実験により明らかになった。表4で示す様にH₂O₂-NaOC₂系において、薬物は、30 μ Mで化学発光を60%抑制した。

イ酸等の賦形剤、水、エタノール、プロパノール、ブドウ糖、^液デンプン液、ゼラチン溶液、カルボキシメチルセルロース、メチルセルロース、リン酸カリウム等の結合剤、乾燥デンプン、アルギン酸ナトリウム、カンテン末、炭酸水素ナトリウム、炭酸カルシウム、ステアリン酸モノグリセリド、デンプン、乳糖等の崩壊剤、ステアリン酸塩、ホウ酸末、固体ポリエチレングリコール等の滑沢剤等この分野で広く用いられているものを使用することができる。更に必要に応じて糖衣錠、ゼラチン被包錠、フィルムコーティング錠等にすることもできる。

注射剤として調製される場合には、希釈剤として例えば水、エチルアルコール、プロピレングリコール、ポリオキシエチレンソルビット、ソルビタンエステル等をあげることができる。この際、等張性の溶液を調製するのに十分な量の食塩、ブドウ糖あるいはグリセリンを含有させてもよく、また、通常の溶解補助剤、緩衝剤、無痛化剤、保存剤等を必要に応じて含有させてもよい。

特開昭63-264525(4)

以上に述べたように、前記一般式(1)で表わされるビペラジン誘導体またはその無毒性塩は、優れた活性酸素産生抑制ならびに活性酸素除去作用を有し、抗炎症剤、抗リウマチ剤、消化管疾患治療剤、抗白内菌剤、自己免疫疾患治療剤として有用である。

次に本発明において、有効成分として用いられる一般式(1)の化合物およびその無毒性塩が活性酸素抑制ならびに活性酸素除去作用を有する医薬組成物として有用であり、安全性が高いことを示す試験例と一般式(1)の化合物の製剤例を示す実施例を挙げて本発明を具体的に説明する。

実施例1

方法

試薬

ホルミル-メチオニル-ロイシル-フェニアラニン(FMLPと略す)、ルミノール、キサンチンオキシダーゼ(XODと略す)(0.6 U/mg蛋白質)、カタラーゼ(26,000 U/mg蛋白質)はシグマ社製を用いた。ハイポキサンチン、過酸化水素(3%)、

化学発光(CLと略す)の測定

CLはルミフォトメーター(model TD4000; ラボサイエンス社製)で測定し、ミリボルトを記録した。他に言及しない限り反応混合物は2.5 mlのCaCl₂および5 mMのKClを含有するHEPES-Salineに浮遊させた細胞浮遊液(1×10⁷細胞/ml)0.2 ml,ルミノール(最終濃度30 μM)および薬物より成り、0.5 mlのポリスチレン製のキュベット中で反応を行った。薬物は、H₂O₂+NaOCl系及びハイポキサンチン-XOD系で生成したルミノール依存性のCLを抑制する能力についてもテストした。

同量(0.1 ml)の10 μM H₂O₂と30 μMのルミノールそして薬物又は緩衝液を予め混和し、37℃に温度制御したルミフォトメーターの計数室においたのち10 μMのNaOCl(0.1 ml)を注入することで活性化した。

XODで触媒されるスーパーオキシドアニオンの生成は、同様な方法により連続的にモニターした。20 μlの

薬

次亜硝酸酸(5%溶液)は、和光純薬(株)を用いた。

FMLPとルミノールは、HEPES-Saline(5 mMのN-2-ヒドロキシエチルピペラジン-N'-2-エタンスルホン酸pH 7.4で緩衝化された生理食塩水)で希釈する前にジメチルスルホキサイド(DMSO)に溶解した。反応混合物中のDMSOの最終濃度は10 μMで、この濃度は反応に影響を与えなかった。

顆粒球の調製

ヘパリンを添加した血液(70~80 ml)を雄性白兔(2.2~3.0 kg)から得、生理食塩水中2%デキストラン(半井化学(株)製)に混和した。赤血球を室温で30分間沈澱させた。白血球に富んだ血しょうをナトリウムメトリゾエートフィコール溶液(ニーガアードNyegaard社製)に重層した後、4℃、40分間800 rpmで遠心分離した。ペレットに155 mMの塩化アンモニウム溶液を加え赤血球を溶かした。残存する顆粒球を冷HEPES-Salineで2度洗浄し、同じ溶媒に再懸濁した。

ml)をハイポキサンチン(1 mM)、ルミノール(30 μM)そして種々の濃度の薬物又は緩衝液を含むキュベットに添加した。発光量はCL曲線下面積により評価し、コントロールのCLと比較して抑制率を求めた。

被験薬物としては、(2R,3R)-3-[(S)-3-メチル-1-(4-(2,3,4-トリメトキシフェニルメチル)ピペラジン-1-イルカルボニル)ブチルカルバモイル]オキシラン-2-カルボン酸エチル $\frac{1}{2}$ 硫酸塩を用いた。

実験1 ルミノール依存性の化学発光生成に対する薬物の効果(in vitro)

顆粒球(1×10⁶細胞/ml)を種々の濃度の薬物と37℃で30分間インキュベートしたのち遠心分離し薬物を除くため2度HEPES-saline(4℃)で洗浄した。その後、10分間インキュベート(37℃)した後FMLP刺激により生成したCLを測定した。その結果を表1に示す。

表 1

薬物濃度	抑制率
1×10^{-6} (M)	13.6 ± 5.1 (%)
3×10^{-6}	23.1 ± 3.9
1×10^{-5}	32.7 ± 3.1
3×10^{-5}	90.4 ± 3.8
1×10^{-4}	93.4 ± 2.3
3×10^{-4}	98.5 ± 1.2
1×10^{-3}	—

実験2 ルミノール依存性の化学発光生成に対する薬物の効果 (in vivo)

12匹の雄性白兔 (2.0 ~ 2.3 kg) を無作為に薬物処置又はコントロール群に振り分けた。薬物 (20 mg/kg) は5 mlの生理食塩水に溶かし、5分間を要し静注した。コントロールも同様に生理食塩水を投与した。

注入5分後にヘパリン添加血液を得た。

顆粒球は顆粒球の調製で記載した方法により得た。その結果を表2に示す。

表 3

薬物濃度 (M)	抑制率 (%)
0	0.00
3×10^{-5}	4.63 ± 0.93
1×10^{-4}	18.90 ± 2.19
3×10^{-4}	47.21 ± 1.03
1×10^{-3}	85.00 ± 0.43
3×10^{-3}	98.88 ± 0.11

実験4 $H_2O_2 + NaOCl$ 系のルミノール依存性化学発光に対する薬物の効果 (除去効果)

表 4

薬物濃度 (M)	抑制率 (%)
0	0.00
3×10^{-7}	13.5 ± 6.1
3×10^{-6}	24.0 ± 5.7
3×10^{-5}	60.1 ± 8.2
3×10^{-4}	85.5 ± 4.8
3×10^{-3}	94.8 ± 3.5

本発明の活性成分である一般式(1)で表わされる化合物は、実験1及び2から活性酸素産生抑制作用を有することが明らかとなり、また実験3及び4から発生した活性酸素の除去効果をも有す

表 2

化学ルミノッセンス (mV)	CLカーブ下の面積	
	コントロール	薬物
MEAN	11.23	6.23
S.D.	1.91	3.13

* $p < 0.05$ (Mann-Whitney U Test)

実験3 ハイポキサンチン-キサンチンオキシゲナーゼ系のルミノール依存性化学発光に対する薬物の効果 (除去効果)

20 μ lのXOD (4 U/ml)をハイポキサンチン (1 mM)、ルミノール (50 μ M)、種々の薬物を含むキューベットに添加した。CL生成はCLカーブ下の面積で評価し、CL反応を100%に設定したコントロールと比較した。その結果を表3に示す。

ることが明らかとなった。

実施例2

急性毒性試験

体重20 ~ 28 gのddM系雄性マウスを用いた。薬物は尾静脈より投与した。その結果、表5に示すように本発明の薬剤は安全性が高いことが確認された。

表 5

化合物	LD ₅₀ (mg/kg i.v.)
化合物1	374
" 2	MLD > 1125
" 3	345
" 4	MLD > 1125

但し、化合物1 (2R,3R)-3-(s)-3-メチル-1-(4-(2,3,4-トリメトキシフェニルメチル)ピペラジン-1-イルカルボニル)ブチルカルバモイル)オキシラン-2-カルボン酸エチル塩硫酸塩
化合物2 (2R,3R)-3-(s)-3-メチル-1-(4-(2,3,4-トリメトキシフェニルメチル)ピペラジン-1-イルカル

特開昭63-264525(6)

ルボニル}ブチルカルバモイル}オキシ
ラン-2-カルボン酸ナトリウム
化合物3 (2S,3S)-3-[(s)-3-メチ
ル-1-(4-(2,3,4-トリメトキシフ
エニルメチル)ピペラジン-1-イルカ
ルボニル}ブチルカルバモイル}オキシ
ラン-2-カルボン酸エチル $\frac{1}{2}$ 硫酸塩
化合物4 (2S,3S)-3-[(s)-3-メチ
ル-1-(4-(2,3,4-トリメトキシフ
エニルメチル)ピペラジン-1-イルカ
ルボニル}ブチルカルバモイル}オキシ
ラン-2-カルボン酸ナトリウム

実施例3 製剤例(錠剤)

1錠(220mg)中下記成分を含有するフィル
ムコーティング錠とする。

(2R,3R)-3-[(s)-3-メチル-1
-(4-(2,3,4-トリメトキシフェニ
ルメチル)ピペラジン-1-イルカル
ボニル}ブチルカルバモイル}オキシ
ラン-2-カルボン酸ナトリウム 50mg

乳糖 100mg
結晶セルロース 50mg
ステアリン酸マグネシウム 1mg
ヒドロキシプロピルメチルセルロース 15mg
ヒドロキシプロピルセルロース 4mg

本発明において有効成分として用いられる他の
化合物も同様な処方によりフィルムコーティング
錠とすることが可能である。

実施例4 製剤例(顆粒)

顆粒1g中下記成分を含有する。

(2S,3S)-3-[(s)-3-メチル-1
-(4-(2,3,4-トリメトキシフェニ
ルメチル)ピペラジン-1-イルカル
ボニル}ブチルカルバモイル}オキシ
ラン-2-カルボン酸エチル $\frac{1}{2}$ 硫酸塩 200mg

乳糖 500mg
トウモロコシデンプン 300mg

本発明において有効成分として用いられる他の
化合物も同様な処方により顆粒とすることが可能

である。

実施例5 製剤例(注射剤)

1アンプル中下記成分を含有する。

(2R,3R)-3-[(s)-3-メチル-1
-(4-(2,3,4-トリメトキシフェニ
ルメチル)ピペラジン-1-イルカル
ボニル}ブチルカルバモイル}オキシ
ラン-2-カルボン酸エチル $\frac{1}{2}$ 硫酸塩 20mg

上記成分に無菌蒸留水を10mlとなるように
加える。

本発明において有効成分として用いられる他の
化合物も同様な処方により注射剤とすることが可
能である。

特許出願人 日本ケミファ株式会社
代表者 丑山圭三